



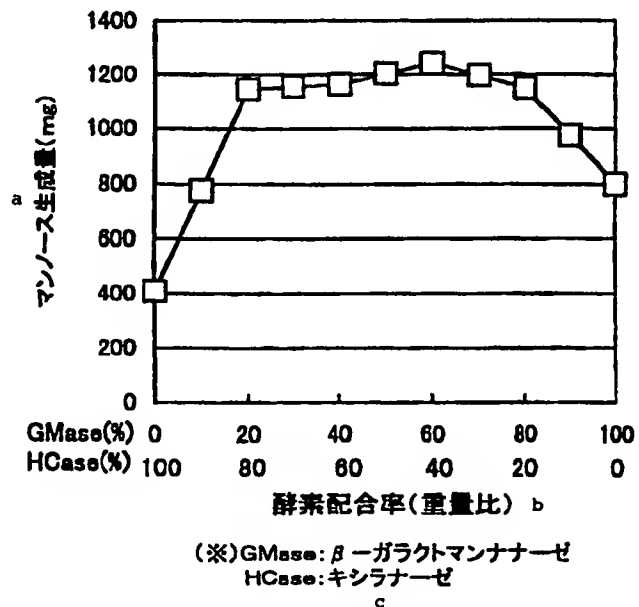
(51) 国際特許分類7 <b>A23K 1/16, C12P 19/02</b>	<b>A1</b>	(11) 国際公開番号 <b>WO00/49890</b>  (43) 国際公開日 2000年8月31日(31.08.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01087 (22) 国際出願日 2000年2月25日(25.02.00) (30) 優先権データ 特願平11/52035 1999年2月26日(26.02.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 不二製油株式会社(FUJI OIL CO., LTD.)(JP/JP) 〒542-0086 大阪府大阪市中央区西心斎橋2丁目1番5号 Osaka, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 横溝 太(YOKOMIZO, Futoshi)(JP/JP) 〒598-8540 大阪府泉佐野市住吉町1番地 不二製油阪南事業所内 Osaka, (JP)		(81) 指定国 ID, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title: **MANNOSE-CONTAINING COPRA MEAL COMPOSITIONS**

(54) 発明の名称 マンノース含有コブラミール組成物

(57) Abstract

Mannose-containing copra meal compositions obtained by treating copra meal with two enzymes including xylanase and  $\beta$ -galactomannase and a process for producing the same. Combined use of these two enzymes makes it possible to efficiently and economically release mannose. By adding the above compositions or mannose obtained by extracting these compositions to feeds, it is expected that salmonellae can be eliminated economically.



a...MANNOSE YIELD (mg)

b...ENZYME COMPOSITION RATIO (BY WEIGHT)

c...(\*) Gmase:  $\beta$ -GALACTOMANNASE

Hcase: XYLANASE

(57)要約

本発明は、コブラミールにキシラナーゼおよび $\beta$ -ガラクトマンナーゼの2種類の酵素を作用させて得られるマンノース含有コブラミール組成物およびその製造法を骨子とし、2種の酵素を組み合わせることにより効率的かつ経済的にマンノースを遊離させることが出来、本発明のマンノース含有コブラミール組成物あるいは、当該組成物から抽出して得られるマンノース類を、飼料に添加することにより、経済的なコストでサルモネラ菌の排菌効果が期待できる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BH	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明細書

### マンノース含有コブラミール組成物

#### 技術分野

本発明は、飼料添加用として特にサルモネラ菌排菌効果の期待されるマンノースを含有するコブラミール組成物およびその製造方法に関する。

#### 背景技術

従来より、飼料にマンノース類を添加することによりサルモネラ菌の排菌効果が期待されることが知られている (Poultly Science 1989 68 1357)。また、ヤシ油を搾った粕として産出されるコブラミールにマンナンが豊富に含有されることも従来より知られており、コブラミールなどガラクトマンナン類を含む原料に酵素を作用させて得られるマンノース多糖体を家畜用飼料に配合することにより、サルモネラ汚染防止に効果があるとの報告もなされている (特開平8-173055号)。しかし、これらは、使用する酵素が $\beta$ -マンノシダーゼあるいはガラクトマンナーゼ単体もしくは $\alpha$ -ガラクトシダーゼとの組み合わせであり、目的成分もマンノースのオリゴ糖ないしは多糖類であってマンノースではない。マンノース類は、単糖とオリゴ糖、多糖類では効能に差があり、単糖のマンノースがサルモネラ菌に対して最も有用に働くとの報告もあるが、マンノースは高価であり飼料への添加は養鶏業界にとっては経済的負担となる。このような事情から、効果と製造コストの面を考慮した上でさらに安価な飼料添加用のマンノースを提供することが市場から求められている。

#### 発明の開示

既述のように、単糖のマンノースは有害細菌の排除効果が認められており、飼料に添加することが求められているが、非常に高価であり殆ど実

用されていない。また、オリゴマンノースが開発されているがサルモネラに対する排菌効果はあまり期待できない（鶏病研究報告1995 31 113）。

コブラミールはヤシ油を搾った粕として産出され、それ自体が動物の飼料として利用されている。しかし、その中に30～36%含まれるコブラマンナンは難消化性である上、サルモネラ菌の排除効果もあまり無く、有効に利用されているとは言い難い。本発明者は $\beta$ -ガラクトマンナーゼおよびキシラナーゼを組み合わせることでコブラミールに作用させると、1種の酵素のみによる場合よりも多量に単糖のマンノースが遊離することを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち本発明は、コブラミールにキシラナーゼおよび $\beta$ -ガラクトマンナーゼの2種類の酵素を作用させて得られるマンノース含有コブラミール組成物、およびその製造方法を骨子とする。

使用する $\beta$ -ガラクトマンナーゼは、市販されているもの（例えばヘミセルラーゼGM「アマノ」/天野製薬株式会社、スミチームACH/新日本化学工業株式会社）で良く、キシラナーゼについても市販品でよい（例えばヘミセルラーゼ「アマノ」90/アマノ製薬株式会社等）。尚、これら市販品で入手可能なもののほとんどはいずれも *Aspergillus niger* 由来である。

使用する酵素量は、コブラミール10gに対して、キシラナーゼ及び $\beta$ -ガラクトマンナーゼ活性の合計値として1000u～5000u（ユニット）を目安とし、キシラナーゼの $\beta$ -ガラクトマンナーゼに対する酵素活性比が0.2～1.2、好ましくは、0.5～8、より好ましくは、1.3～3とするのが良い。キシラナーゼ活性が小さすぎたり、 $\beta$ -ガラクトマンナーゼ活性が小さすぎると効率的な反応が困難となる。

これら酵素をコブラミールに作用させる。コブラミールはヤシ油を搾った粕として産出するものが使用でき、通常その中にマンナンを30～36重量%程度含有するものである。酵素はコブラミールと均一に混合すればよいが、コブラミールは非常に吸水性が高いため、均一混合に必要な反応系の水分量はかなり必要である。しかし、マンノースの精製工程などで水分を除去する必要から必要最小限にとどめるべきであり、適する水分量は、反応系中50～70重量%、好ましくは58～62重量%である。キシラナーゼ、 $\beta$ -ガラクトマンナーゼは、別々に添加することもできるが、上記反応系の水分量となるような量の水に両酵素を溶解した水溶液を用意し、コブラミールに添加して混合するのが簡便である。

次に、酵素反応に移行するが、本発明における酵素反応の形式は2段階になっており、まずキシラナーゼを作用させあらかじめマンナンを大まかに分解し、後に $\beta$ -ガラクトマンナーゼを作用させてマンノースを得るのが効率的である。このために、先ず、キシラナーゼの作用する至適温度に一定期間保持し、その後、 $\beta$ -ガラクトマンナーゼの指摘温度で反応を進めるとよい。 $\beta$ -ガラクトマンナーゼの至適温度の方が、キシラナーゼの至適温度よりも高温であるため、最初から両酵素を添加しておいても至適温度の低い酵素に失活などのダメージが少なく、至適温度を変化させるのに反応系を冷却する必要もなく好都合である。

本法により処理したコブラミールは遊離の単糖のマンノースを含んでおり、そのままあるいは適宜乾燥させて飼料に配合するか、もしくは水溶性画分を抽出して飼料に添加することにより、特にサルモネラ菌の排除効果を発揮することが出来る。

例えば、本発明によるとコブラミール100gから10～15gのマ

ンノースが生じ、これは全体の4～7.5%程度に当たるためこの反応処理後のコブラミールをそのまま乾燥した飼料等に配合することもできる。その配合量を0.25～1%程度とすれば配合飼料でのマンノースの含量は0.01～0.075%となりサルモネラ菌など有害細菌の排除効果が得られるのである。

以下に本発明の実施例を示し本発明をより詳細に説明するが、本発明の精神は以下の実施例に限定されるものではない。なお、例中、%及び部は、いずれも重量基準を意味する。

#### 実施例及び比較例

以下に本発明の実施例を示し本発明をより詳細に説明するが、本発明の精神は以下の実施例に限定されるものではない。なお、例中、%及び部は、いずれも重量基準を意味する。

圧搾コブラミール10gに対し、キシラナーゼおよび $\beta$ -ガラクトマンナーゼの合計重量を1/30g一定とし、両酵素の配合率を、0:100～100:0まで種々変化させて調製した酵素液15gを混合して反応を行った(表1)。反応は、混合物を密閉容器に入れ、50℃24時間インキュベーターに静置保管した後、60℃48時間インキュベーターに静置保管反応させて行った。尚、キシラナーゼは、ヘミセルラーゼ「アマノ」90(アマノ製薬株式会社製 商品名、キシラナーゼ活性90000u/g以上)。 $\beta$ -ガラクトマンナーゼは、ヘミセルラーゼGM「アマノ」(天野製薬株式会社製 商品名、 $\beta$ -ガラクトマンナーゼ活性45000u/g以上)を使用した。

表1に示す結果から、 $\beta$ -ガラクトマンナーゼとキシラナーゼを組み合わせたものは各酵素を単体で使用的場合より、マンノースの生成量

が多くなることがわかる。尚、生じたマンノースの定量は次のように行った。酵素処理コブラミールに50gの水を加え沸騰浴中にて10分間保持し、酵素を失活させると同時に水溶性成分を水層に溶解させた後、全体を100mlに定容し、ろ過して水溶液を得た。この溶液を除たん白するなど適宜前処理し、高速液体クロマトグラフィーを使用してマンノース量を調べた。

(表1)

$\beta$ -ガラクトマンナーゼ対キシラナーゼ重量比

0:100 10:90 20:80 30:70 40:60 50:50

---

$\beta$ -ガラクトマンナーゼ活性	0u	150u	300u	450u	600u	750u
キシラナーゼ活性	3000u	2700u	2400u	2100u	1800u	1500u
マンノース生成量(mg)	406	775	1144	1154	1163	1202

---

$\beta$ -ガラクトマンナーゼ対キシラナーゼ重量比

60:40 70:30 80:20 90:10 100:0

---

$\beta$ -ガラクトマンナーゼ活性	900u	1050u	1200u	1350u	1500u
キシラナーゼ活性	1200u	900u	600u	300u	0u
マンノース生成量(mg)	1241	1195	1149	974	799

---

図面の簡単な説明

第 1 図は、表 1 に示すマンノース生成量をグラフ化したものである。

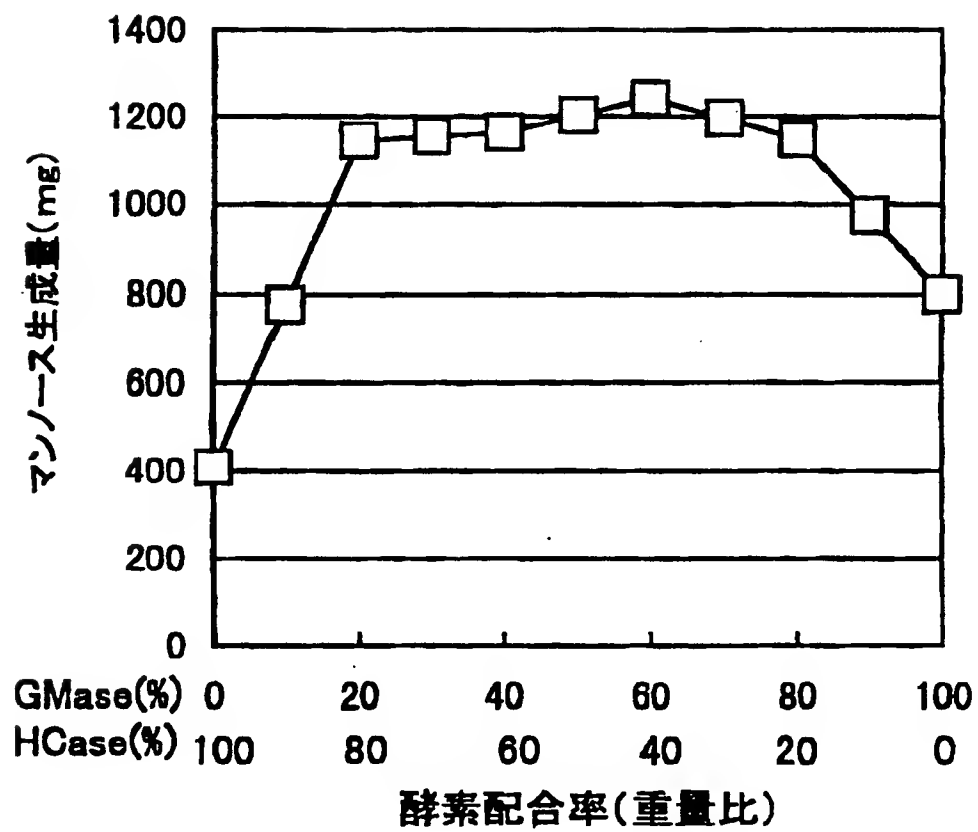


## 請求の範囲

- (1) コブラミールにキシラナーゼおよび $\beta$ -ガラクトマンナーゼの2種類の酵素を作用させて得られるマンノース含有コブラミール組成物。
- (2) コブラミールにキシラナーゼおよび $\beta$ -ガラクトマンナーゼの2種類の酵素を作用させ、マンノース含有コブラミール組成物を製造する方法。
- (3) キシラナーゼの $\beta$ -ガラクトマンナーゼに対する酵素活性比が0.2～1.2である請求項1記載の組成物。
- (4) キシラナーゼの $\beta$ -ガラクトマンナーゼに対する酵素活性比が0.2～1.2である請求項2記載の方法。
- (5) コブラミールにキシラナーゼを作用させ、次いで $\beta$ -ガラクトマンナーゼを作用させてマンノース含有コブラミール組成物を製造する方法。

1 / 1

第 1 図



(※) GMase:  $\beta$ -ガラクトマンナーゼ  
HCase: キシラーナーゼ

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01087

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl.<sup>7</sup> A23K 1/16, C12P 19/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl.<sup>7</sup> A23K 1/16, C12P 19/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JOIS, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PY	JP, 11-137288, A (Osaka City), 25 May, 1999 (25.05.99), Par. Nos. [0009], [0011] (Family: none)	1-5
Y	JP, 8-38064, A (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), 13 February, 1996 (13.02.96) (Family: none)	1-5
Y	JP, 8-173055, A (Shinichi SANADA), 09 July, 1996 (09.07.96) (Family: none)	1-5
Y	JP, 10-117800, A (Akita Prefecture), 12 May, 1998 (12.05.98) (Family: none)	1-5
A	JP, 7-236429, A (Seibutsu Kagaku Sangyo Kenkyusho K.K.), 12 September, 1995 (12.09.95) (Family: none)	1-5
A	JP, 11-18793, A (UNITIKA Ltd.), 26 January, 1999 (26.01.99) (Family: none)	1-5



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
28 March, 2000 (28.03.00)

Date of mailing of the international search report  
11.04.00

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. <sup>7</sup> A23K 1/16, C12P 19/02

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. <sup>7</sup> A23K 1/16, C12P 19/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JOIS, BIOSIS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PY	JP, 11-137288, A(大阪市) 25. 5月. 1999(25. 05. 99), 【0009】, 【0011】 ファミリーなし	1-5
Y	JP, 8-38064, A(明治製菓株式会社) 13. 2月. 1996(13. 02. 96) ファミリーなし	1-5
Y	JP, 8-173055, A(星田真一) 9. 7月. 1996(09. 07. 96) ファミリーなし	1-5
Y	JP, 10-117800, A(秋田県) 12. 5月. 1998(12. 05. 98) ファミリーなし	1-5
A	JP, 7-236429, A(有限会社生物科学産業研究所) 12. 9. 1995(12. 09. 95) ファミリーなし	1-5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 03. 00

国際調査報告の発送日

11.04.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子



2B 9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3236

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 11-18793, A(ユニチカ株式会社) 26. 1月. 1999 (26. 01. 99) ファミリーなし	1 - 5